

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2013.10.016

# 慢传输型便秘动物模型研究进展

刘 兴<sup>1,2</sup>, 王文革<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国人民解放军空军总医院 儿科,北京 100142;<sup>2</sup> 河北北方学院,河北 张家口 075000)

**关键词:**慢传输型便秘; 动物模型; 肠道传输功能; Cajal 间质细胞

**中图分类号:**R442.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**1671-038X(2013)10-0548-04

慢传输型便秘(slow transit constipation STC)是一种以结肠通过时间延长和结肠动力下降为特征的顽固性便秘,是功能性便秘中常见的类型。随着人们饮食结构、生活习惯以及精神心理等因素的影响,其发病率呈逐年上升趋势。美国一项回顾性研究发现 STC 占慢性便秘患者的 42.0%,是慢性便秘常见的病理类型<sup>[1]</sup>。国内流行病学调查显示,天津、重庆地区的发病率分别为 3.1%、11.6%<sup>[2-3]</sup>。在儿童期其发病率为 3.0%~8.0%,占整个胃肠门诊就诊儿童的 20.0%~25.0%<sup>[4-5]</sup>。但由于临床上真正需要手术治疗的 STC 患者仅仅是少部分,无法取得足够的研究资料,难以对 STC 患者进行前瞻性研究,因而目前对该病发病原因、发生机制、防治方法等仍未能系统全面地了解。因此建立一种简单、可重复性强,符合临床特点的动物模型,对深入研究 STC 病理机制意义重大。

## 1 动物的选择

目前,国内外通常使用大鼠、小鼠制备 STC 动物模型。也有研究人员使用豚鼠、狗、家兔等制备该模型。

### 1.1 大鼠

大鼠作为制备便秘模型的常用动物,具有许多优点,如价格便宜、来源广、易饲养、繁殖力强,解剖和生理性质与人类相似、标本采集较充足,对传染病的抵抗力较强等。国内常用的品系是 Wistar、SD 大鼠,多采用 6~8 周龄,体质量多为 180~280 g,雌雄均可。亦有报道雄性大鼠对大黄较雌性大鼠敏感,故泻剂结肠造模时可选择雄性大鼠。Wistar、SD 大鼠耐受性好,性情温顺,造模过程中对外界环

境适应性强,不易死亡,造模成功率高,是泻剂结肠、复方苯乙哌啶法建立 STC 模型的常用实验动物。

### 1.2 小鼠

小鼠作为常用的实验动物亦有经济、易得,品系纯等优点,但小鼠耐受力较大鼠差,不适宜长期给药造模,因而在 STC 造模应用中受到限制。但通过实验观察发现小鼠对吗啡等阿片类镇痛药所致的便秘表现明显,这符合癌症晚期患者缓解疼痛大剂量使用阿片类镇痛药所致的严重、持久的便秘,且吗啡法造模过程相对较短,约 45d,故小鼠主要用于吗啡法建立 STC 动物模型。常用品系为 ICR 鼠、昆明小鼠,体质量为 20~25g,雌雄不限。

此外,狗、猕猴等根据不同便秘模型的需要也常用作便秘动物模型,但 STC 动物模型建立时往往需要的动物数量较多,这些动物由于来源少,且价格贵,在 STC 模型应用中受到限制。家兔在建立出口梗阻型便秘动物模型时应用较多。

## 2 STC 模型的制备方法

便秘模型制备方法种类较多,根据不同的研究目的、研究条件、研究中侧重点不同,采用不同的动物模型。以下主要介绍几种常用的 STC 动物模型的造模方法。

### 2.1 泻剂结肠

目前建立该动物模型常用的泻剂主要有大黄、酚酞。该模型主要是利用大黄、酚酞的泻下作用,通过长期使用接触性泻剂导致大鼠腹泻,最终形成不接触泻剂不排便的泻剂结肠。

2.1.1 大黄 大黄价廉、来源广,药效确定,临床上应用较广,是目前最常用的造模药物之一。生大黄

收稿日期:2013-07-13

通讯作者:王文革,E-mail:1264516006@qq.com

[8] 畅洪昇,梁吉春,石任兵,等. 枳术宽中胶囊对抑郁动物模型的抗抑郁作用研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009,51(10):690-694.

[9] 刘方旭,许 乐. 枳术宽中胶囊治疗功能性消化不良及抑郁症状疗效及安全性多中心、开放、随机对照研究[J]. 世界中医药,2012,7(6):484-485.

造模的具体方法<sup>[6-7]</sup>为用含有大黄粗粉的干饲料喂大鼠,首次给药剂量为  $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,以后每日按  $200\text{mg}$  递增,达到腹泻剂量时,维持此剂量直至稀便消失,再按  $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  递增,如此循环并维持腹泻作用饲养 3 个月。泻剂结肠大鼠模型复制了便秘患者长期服用泻剂后由腹泻到加重便秘的疾病过程,最接近临床上 STC 患者的疾病形成过程,为 STC 发病机制的研究提供了一种简单、可靠、可复性强的动物模型。因此采用该种模型作为 STC 模型来研究具有代表性,但大黄建立泻剂结肠模型时存在以下问题。①不同文献报道大黄致腹泻用量差距较大。有文献报道,大鼠出现稀便时大黄用量为  $2\,700\text{mg}/\text{kg}$ ,该药量达到成人日常用量的 16 倍,已达大黄中毒剂量。李芸等<sup>[8]</sup>实验证实大黄不同品种、不同规格的产地加工品,其蒽醌含量存在很大差异。而蒽醌类化合物是大黄的主要致泻成份,这可能是导致用药量差异的主要原因。②文献中对稀便概念描述模糊。大鼠在饲养过程中可出现粥样便、泥状便、水样便等不同程度稀便。大黄致腹泻过程中对稀便判断无统一标准。③大黄是一味成分复杂的中药,除对胃肠道有影响外,对全身如肾脏、肝脏、胰腺多个系统具有不同功效,对其他系统的作用与泻剂结肠的形成有无相互影响,需进一步研究证实。④有文献报道大黄使便秘大鼠肌间神经丛中的胆碱能神经分布趋于正常,这可能是调节结肠功能、治疗 STC 的机制之一<sup>[9]</sup>。该文献与多数文献报道的大黄致使 STC 大鼠胆碱能神经减少的报道不一致。推测这可能与大黄对胃肠道的双向调节有关。大黄服用时间长短不同是否会对大鼠胃肠道神经系统产生不同的影响,如大黄服用过长会对大鼠胃肠道神经系统产生怎样的影响,有待进一步研究。

**2.1.2 酚酞** 酚酞造模过程与大黄类似,用含酚酞的饲料喂大鼠(或用酚酞混悬液灌胃),起始剂量为  $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,以后每日按  $200\text{mg}$  递增,达到腹泻剂量时,维持此剂量直至稀便消失,再按  $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  递增,如此循环并维持腹泻作用饲养 3 个月,完成造模<sup>[6]</sup>。口服后,酚酞在肠内与碱性肠液形成可溶性钠盐,主要作用于结肠,其药理作用是把水份吸收到肠腔内,刺激肠壁加速蠕动,从而引起腹泻。长期使用导致肠道传输功能明显减慢,结肠肌电表现为慢波频率减慢,产生药物依赖性,形成泻剂结肠。此过程与大黄造模过程类似,造模过程中由于大鼠长期腹泻,易造成水电解质紊乱,免疫力下降,造成动物死亡。

**2.1.3 大黄酸** 随着大黄提取工艺的改进,有文献

报道使用大黄提取物大黄酸建立 STC 动物模型<sup>[10]</sup>。具体方法如下:实验动物进行正常干饲料饲养,以大黄酸液( $20\text{mg}/\text{ml}$ )灌胃。第 1 循环隔日以大黄酸液灌胃 1 次,每次  $1.2\text{ml}/100\text{g}$ ,直至 50% 的大鼠粪便变稀,继续以此剂量灌胃,直至 80% 的大鼠稀便消失;第 2 循环以大黄酸液灌胃,灌 5d 停 2d,用量用法同前,直至 80% 的大鼠稀便消失;第 3 循环以大黄酸液灌胃,灌胃 5d 停 2d,每次  $1.6\text{ml}/100\text{g}$ ,直至 80% 的大鼠稀便消失,3 个循环完成后造模完成。目前认为大黄酸可抑制 LoVo 细胞 AQP4 基因的转录与翻译,下调 AQP4 而使结肠对水的吸收减少<sup>[11]</sup>,使肠内水分增加,导致大鼠腹泻。近期有文献报道 STC 大鼠近端结肠 AQP3 表达下调<sup>[12]</sup>,但大黄酸是否通过对 AQP3 产生影响从而导致便秘,需进一步研究证实。大黄酸、大黄素等游离性蒽醌可促进番泻甙 A 转化为大黄酸蒽酮,大黄酸蒽酮是主要发挥致泻作用的生物物质。虽已证实游离性蒽醌也有泻下作用,但大黄酸单独使用致泻的稳定性鲜有报道。目前国内外对大黄酸建立 STC 动物模型的报道较少,其造模的稳定性及安全性有待进一步证实。

## 2.2 复方苯乙哌啶法

复方苯乙哌啶是目前常用制备 STC 模型的药物之一。复方苯乙哌啶直接作用于肠道平滑肌使肠道蠕动减慢致便秘。刘海峰等<sup>[13]</sup>用含复方苯乙哌啶的饲料饲喂大鼠,给药剂量为  $8\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,将药物混匀到饲料中让大鼠自食,连续喂养 120d。结果,实验组大鼠首粒黑便排出时间显著延长,结肠组织中,Cajal 间质细胞(ICC)较对照组明显减少,结肠推进率明显延长,与便秘患者具有相似的临床症状和病理生理改变。且该模型简单经济,可重复性强,对深入研究 STC 的病因及发病机制具有重要意义。但包云光等通过该模型大鼠研究发现实验组大鼠结肠黏膜一氧化氮(NO)及其合酶(NOS)的含量变化不大,这与文献报道的便秘患者肠黏膜 NO 增加的结果不一致<sup>[14-15]</sup>,也与大黄所致便秘大鼠回肠和结肠 NOS 含量增加的结果不一致<sup>[16]</sup>,其原因尚不清楚,需进一步对该模型所致的结肠 NO 变化的相关问题进行研究。

## 2.3 吗啡法

国内外学者观察到临床应用吗啡等阿片类镇痛药缓解癌症晚期疼痛常伴发严重、持久的便秘,并成功建立了相关的便秘动物模型<sup>[17-19]</sup>。国内建立便秘模型运用较多的是许海尘等<sup>[20]</sup>使用的方法。具体方法为小鼠每日按  $2.5\text{mg}/\text{kg}$  皮下注射盐酸吗啡 1 次,连续 45 d。结果模型小鼠粪便质量减轻,肠推

进率减慢,结肠 C-kit 阳性细胞数减少。吗啡引起便秘的机制可能为其与  $\mu$ -阿片受体特异性结合抑制乙酰胆碱的释放<sup>[21]</sup>、促进多巴胺和 NO 的释放、抑制结肠的运动<sup>[22]</sup>有关。近年来有报道吗啡通过下调钠通道来抑制肠神经的兴奋性,这可能也是吗啡造成便秘的可能机制之一<sup>[23]</sup>。国外报道吗啡所致便秘使用纳洛酮阻断后可使结肠通过时间趋于正常<sup>[24]</sup>,提示 STC 小鼠肠道存在 ICC 的异常改变、外源性吗啡与小鼠结肠 ICC 的变化存在相关性,提示阿片肽活性的变化可能是 STC 的发病机制之一。该模型适合研究与阿片受体相关的 STC 的发生机制。

### 3 模型的检测方法

造模完成后对所建立动物模型进行验证,是动物模型建立后首要考虑的问题。目前多采用粪便性状、24h 粪便量、大鼠体质量、肠道传输功能的测定,ICC 形态及数量改变等方面,验证是否为 STC 动物模型。

#### 3.1 一般检测

根据造模方法的不同,造模过程中可记录大鼠体质量、粪便性状、24h 排便量、每粒大便质量、粪便含水量等方面,初步鉴定是否造成动物便秘,是否符合临床便秘患者大便次数减少、粪便干硬、排便时间延长等临床表现。

#### 3.2 肠道传输功能的测定

造模完成后可采用活性碳灌胃法,记录首粒黑便排出时间或计算碳末推进长度,检测结肠通过时间。采用半固体营养糊灌胃法<sup>[25]</sup>,可同时检测胃动力及肠道传输功能。葡聚糖蓝-2000 法、硫酸钡法<sup>[26]</sup>检测胃肠道传输功能,避免动物大便及碳末均为黑色,易造成测量误差等缺点,因此在肠道传输功能测定方面应用逐渐增多。肠道传输功能减慢,符合 STC 患者结肠传输功能低下的生理改变,初步鉴定是否为 STC 动物模型。

#### 3.3 ICC

STC 是以结肠传输减慢为主要特点的顽固性便秘,而 ICC 在胃肠电生理、动力发生及动力障碍机制上具有重要作用。Lee 等<sup>[27]</sup>收集临床上接受结肠切除术的 STC 患者和非梗阻性结肠癌患者结肠标本,发现 STC 患者结肠中的 ICC 密度比结肠癌组明显减少。研究证实 ICC 与胃肠动力发生及动力障碍机制有重要关系<sup>[28-29]</sup>。除 C-kit 受体外,Ano1 是一种新发现的 ICC 的特异性标志物<sup>[30]</sup>,对其进行免疫组化染色,亦可鉴定 ICC。造模完成后对所取标本分别进行常规染色及免疫组化染色,分别于光镜及电镜下观察 ICC 的形态学变化,验证模

型是否成功。但 ICC 与多种胃肠动力障碍疾病相关,其减少及形态学改变并不是 STC 的特异性病理改变,用其作为判断慢传输便秘模型是否建立成功标准,尚存在争议,因此积极寻找 STC 特异性病理改变,对 STC 的诊断具有重大意义。

### 4 小结

临床上 STC 的病因是复杂的,包括肠神经系统、ICC 及胃肠内分泌系统等方面。以上模型均复制了临床上 STC 患者部分临床及病理生理改变,对于 STC 的发病机制的研究意义重大。但各模型中均存在一定的问题,需要在以后造模过程中逐渐克服,为建立一种更加简单、有效,符合临床的 STC 动物模型努力。

### 参考文献

- [1] SHAHID S, RAMZAN Z, MAURER AH, PARKMAN HP, et al. Chronic idiopathic constipation: more than a simple colonic transit disorder[J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46: 150-154.
- [2] 阙志超, 姚宏昌, 龙治平, 等. 天津市成年人慢性便秘调查及相关因素分析[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(10): 612-614.
- [3] 向国春, 龙庆林, 刘 利, 等. 重庆市人群便秘患病率流行病学研究[J]. 重庆医学, 2004, 33(10): 1541-1543.
- [4] LOENING BAUCKE V. Prevalence symptoms and outcome of constipation in infants and toddlers[J]. J Pediatr, 2005, 146: 359-363.
- [5] LUDVIGSSON J F, ABIS Study group. Epidemiological study of constipation and other gastrointestinal symptoms in 8000 children[J]. Acta Paediatr, 2006, 95: 573-580.
- [6] 张连阳, 高峰, 童卫东, 等. 大鼠泻剂结肠模型的建立[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(10): 864-866.
- [7] 赵士彭, 赵 发, 冯文斌, 等. 便秘大鼠肠道血管活性肠肽的变化及其临床价值[J]. 山东医药, 2006, 46(3): 27-28.
- [8] 李 芸, 苗小楼, 吴平安, 等. 大黄不同品种不同产地加工品的蒽醌含量比较[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2257-2261.
- [9] 汪兴伟, 刘海峰, 徐 梅, 等. 大黄对慢传输型便秘大鼠肌间神经丛胆碱能神经的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(15): 1685-1689.
- [10] 张 波, 丁义江. 大黄酸建立“泻剂结肠”大鼠模型的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1815-1916.
- [11] 张文生, 李 锋, 鲍军强, 等. 大黄酸对 LoVo 细胞水通道蛋白 4 表达的调节效应[J]. 中药材, 2008, 31(5): 702-706.
- [12] 智 会, 袁维棠. 水通道蛋白 3、4、8 在大鼠慢传输型便秘模型结肠粘膜中的表达[J]. 中华胃肠外科, 2011, 14(6): 459-461.

[13] 刘海峰,何俊堂,汪兴伟,等.大鼠慢传输型便秘的建立及其结肠肌电变化检测[J].武警医学,2004,15(12):887—891.

[14] 易宏辉,李富军,邹益友.特发性便秘患者乙状结肠黏膜VIP、NOS阳性神经的变化[J].现代生物医学进展,2008,8(4):679—682.

[15] TOMITA R,FUJISAKI S,IKEDA T,et al. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation[J]. Dis Colon Rectum, 2002, 45: 593—600.

[16] 赵士彭,桂 林,卞红磊,等.便秘大鼠肠壁内一氧化氮合酶表达和肠嗜铬细胞改变的可复性研究[J].结直肠肛门外科,2008,14(1):21—24.

[17] ISE Y,KATAYAMA S,HIRAMO M,et al. Effects of fluvoxamine on morphine-induced inhibition of gastrointestinal-transit,antinociception and hyperlocomotion in mice[J]. Neurosci Lett,2001,299:29—32.

[18] FRIEDMAN J D,DELLO BUONO F A. Opioid antagonists in the treatment of opioid-induced constipation and pruritus[J]. Ann Pharmacother,2001,35:85—91.

[19] 林 琳,姜柳琴,张红杰,等.结肠慢传输运动小鼠模型建立的初步探讨[J].诊断学理论与实践 2006,5(1):31—34.

[20] 许海尘,林 琳,张红杰,等.慢传输型便秘模型的建立及其机制探讨[J].医学研究生学报,2004,17(6):502—504.

[21] STORR M,GAFFAL E,SCHUSDZIARRA V,et al. EM 1 and EM 2 reduced relaxant nonadrenergic,noncholinergic neurotransmission in rat gastricfundus[J]. Life Sci,2002,71:383—389.

[22] BUJDOSO E,JASZBERENY I M,GARDI J,et al. The involvement of dopamine and nitric oxide in the endocrine and behaviouras action of endomorphin1[J]. Neuroscience,2003,120:261—268.

[23] SMITH T H,GRIDER J R,DEWEY W L,et al. Morphine decreases enteric neuron excitability via inhibition of sodium channels[J]. PLoS One,2012,7:e45251—45251.

[24] NETZER P,SENDENSKY A,WISSMEYER M P,et al. The effect of naloxone-3-glucuronide on colonic transit time in healthy men after acute morphine administration: a placebo-controlled double-blinded crossover preclinical volunteer study [J]. Aliment Pharmacol Ther. 2008,28:1334—1341.

[25] 陈 奇.中药药理研究方法[M].北京:人民卫生出版社,1993:332—332.

[26] 钱 宁,巫全胜,赵菊花,等.一种新的小鼠肠道传输功能的检测方法[J].实验动物科学,2007,24(3):60—62.

[27] LEE J I,PARK H,KAMM M A. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow transit constipation and acquired megacolon [J]. J Gastroenterol Hepatol,2005,20:1292—1298.

[28] STEUTKER C J,HUIZINGA J D,DRIMAN D K,et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I:normal ICC structure and function with associated motility disorders[J]. Histopathology,2007,50:176—189.

[29] FARRUGIA G. Interstitial cells of Cajal in health and disease [J]. Neurogastroenterol Motil,2008,20:54—63.

[30] KASHYAP P,GOMEZ-PINILLA P J,POZO M J,et al. Immunoreactivity for Ano1 detects depletion of Kit-positive interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Neurogastroenterol Motil,2011,23:760—765.

“黏”与“粘”的使用规范

“黏”与“粘”在使用中容易混淆,是常有的事。根据第5版的《现代汉语规范词典》的注解,这2个字是有区别的。这2个字不仅读音不同、字形不同,用法也有差异。《现代汉语规范词典》中将“粘”标为动词,“黏”标为形容词。表示动作,用“黏”的东西使物体连接起来,应选择“粘”,如粘信封、粘连、粘附;像糰糊或胶水等所具有的、能使一个物体附着在另一物体上的性质,用“黏”,如黏附分子,这胶水很黏,麦芽糖黏在一块儿了。